

Processes for affinity viscosimetry and viscosimetric affinity sensorPatent Number: ☐ US6267002

Publication date: 2001-07-31

Inventor(s): EHWALD KARL-ERNST (DE); BEYER UWE (DE); EHWALD RUDOLF (DE); THOMAS ANDREAS (DE)

Applicant(s): DISETRONIC LICENSING AG (US)

Requested Patent: ☐ DE19714087Application
Number: US19990416839 19991012

Priority Number(s): US19990416839 19991012; DE19971014087 19970407

IPC Classification: G01N30/00; G01N11/04; G01D9/42

EC Classification: G01N11/08

Equivalents:

Abstract

The invention concerns a process for affinity viscosimetry and a viscosimetric affinity sensor on the basis of sensitive liquids with analyte-dependent viscosity which are localized within a perfusable dialysis chamber and contain colloidal constituents which are cross-linked by affinity bonds. The viscosimetric affinity sensor according to this invention is characterized by the spatial or temporal separation of analyte diffusion from the measurement of the flow resistance for such sensitive liquid flowing through a capillary, needle-like body or other liquid conductor, which integrated combination of a dialysis chamber with viscosimeter enables a researcher to make measurements under lab conditions that provide spatial separation of the dialysis process from the rheological analysis, as done under test conditions where the maximum shear rate of sensitive liquid in the viscosity sensor is at least twice that shear rate of sensitive liquid experienced in the dialysis chamber. An important advantage of the invention consists in small volume-displacement and negligible structural change within the matrix or organ of living tissue to be investigated

Data supplied from the esp@cenet database - I2



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENTAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 197 14 087 A 1**

⑥ Int. Cl.⁸
G 01 N 11/00
B 01 D 61/00

⑲ Akt nz ichen: 197 14 087.4
⑳ Anmeldetag: 7. 4. 97
㉑ Offenlegungstag: 15. 10. 98

DE 197 14 087 A 1

㉒ **Anmelder:**

Ehwald, Rudolph, Prof. Dr., 10115 Berlin, DE;
Ehwald, Karl-Ernst, 15232 Frankfurt, DE; Thomas,
Andreas, Dr., 01796 Pirna, DE; Beyer, Uwe, 09337
Hohenstein-Ernstthal, DE

㉓ **Erfinder:**

gleich Anmelder

㉔ **Entgegenhaltungen:**

DE 1 95 01 159 A1
DE 44 40 095 A1
DE 42 03 466 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

Der Inhalt dieser Schrift weicht von dem am Anmeldetag eingereichten Unterlagen ab

㉕ **Viskosimetrischer Affinitätssensor**

㉖ Die Erfindung betrifft einen viskosimetrischen Affinitätssensor auf der Grundlage sensitiver Flüssigkeiten, deren kolloidale Bestandteile durch Affinitätsbindungen vernetzt sind und sich in einer durchströmbareren Dialyskammer befinden. Der erfindungsgemäße viskosimetrische Affinitätssensor ist durch zeitliche und/oder räumliche Trennung der Analytdiffusion von der Viskositätsmessung und durch das Auftreten hoher Schergeschwindigkeiten bei der Viskositätsmessung gekennzeichnet. Ein wichtiger Vorteil der Erfindung besteht darin, daß die Volumenverdrängung und Strukturbeeinflussung in der zu untersuchenden Matrix sehr gering gehalten werden kann.

DE 197 14 087 A 1

Beschreibung

Viskosimetrische Affinitätsassays und darauf aufbauende Affinitätssensoren nutzen den Befund aus, daß in einer konzentrierten Lösung eines Hydrokolloids und eines di- oder polyvalenten Affinitätsrezeptors, z. B. eines Lektins oder Antikörpers, analytabhängige Viskositäten festgestellt werden, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind: (1) das Hydrokolloid exponiert in wäßriger Lösung eine dem Analyten ähnliche, an den Rezeptor bindende Struktur in zugänglicher Form, (2) die Konzentration des Hydrokolloids liegt über der kritischen Konzentration für die teilweise gegenseitige Durchdringung der Makromoleküle (Ehwald R., Ballerstädt, R., Dautzenberg H: Anal. Bioch. 234, 1-8, 1996).

Bisher bekannte viskosimetrische Affinitätssensoren beruhen auf der Messung des Strömungswiderstandes der in einer Hohlaser befindlichen sensitiven Flüssigkeit, welche o.g. Komponenten in geeigneter Konzentration enthält. Dabei befinden sich zur Kraftübertragung oder Geschwindigkeitsmessung in dem Flüssigkeitsleiter noch andere Medien wie Luft oder Silikonöl, und die Meßanordnung ist so dimensioniert, daß die Strömungswiderstände in dem zur Kraftübertragung genutzten Medium (Gas oder Öl) gegenüber dem Strömungswiderstand der in der Hohlaser befindlichen sensitiven Flüssigkeit gering sind. Ein technisches Konzept des viskosimetrischen Affinitätssensors, das für die Verfolgung eines Zeitverlaufes der analytabhängigen Viskosität geeignet ist, beruht auf Schwingungsmessungen in einem offenen oder geschlossenen Flüssigkeitsleiter (Ballerstädt R., Ehwald R.: Biosensors & Bioelectronics 9, 557-567, 1994, Ehwald, R. DE-OS 19 50 159 A1, 1996) und erfordert Vorrichtungen zur Begrenzung der Menisken auf den Schwingungsbereich.

In wichtigen Anwendungsfällen ist es erwünscht, die Volumenverdrängung und Strukturbeeinflussung durch Einführen des Sensors in das Untersuchungsobjekt, z. B. das Gewebe eines lebenden Organismus, auf ein Mindestmaß zu beschränken. Die bekannte Integration der Dialysekammer in einen geschlossenen Flüssigkeitsleiter mit miniaturisierter Pumpe und Silikonöl als Kopplungsflüssigkeit (Ehwald R., DE-OS 19 50 159 A1, 1996) ist für solche Anwendungsfälle nachteilig, weil die Verwendung flexibler Verbindungsschläuche zwischen der Pumpe und der Dialysekammer mit einer definierten Mittellage der oszillierenden Menisken und einem geringen Strömungswiderstand des Öls nicht kompatibel ist. Andererseits treten in einer in der Hohlaser oszillierenden Flüssigkeit bei längeren Meßzeiten störende Volumenänderungen auf, wenn die Flüssigkeit an die Atmosphäre grenzt (Ballerstädt R., Ehwald R.: Biosensors & Bioelectronics 9, 557-567, 1994).

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, einen viskosimetrischen Affinitätssensor zu entwickeln, der reproduzierbar Zeitverläufe der Analytkonzentration erfaßt. Seine mit der zu untersuchenden Lösung oder Matrix in Verbindung stehenden Teile sollen in ein lebendes Gewebe ohne starke Strukturänderungen eingeführt werden können und auswechselbar sein. Eine Lösung für diese anspruchsvolle Aufgabe gibt die nachfolgend dargestellte Erfindung. Der erfindungsgemäße viskosimetrische Affinitätssensor besitzt folgende Merkmale:

- die Steuerung der Druckverhältnisse und die Geometrie des Flüssigkeitsleiters sind so ausgelegt, daß Diffusion des Analyten in die sensitive Flüssigkeit und die Viskositätsmessung zu unterschiedlichen Zeiten und/oder in unterschiedlichen Räumen stattfinden,
- Druckerzeugung und Flüssigkeitsleiter sind so ausgelegt, daß die maximale Schergeschwindigkeit der

sensitiven Flüssigkeit, die während des Viskositätsmeßvorganges auftritt, die maximale Schergeschwindigkeit der sensitiven Flüssigkeit, die während des Dialysevorganges in der Dialysekammer auftritt, übersteigt und mindestens 5 s^{-1} beträgt.

Das Wesen der vorliegenden Erfindung besteht in der Kombination unerwarteter Eigenschaften der sensitiven Flüssigkeiten mit bisher nicht bekannten Konstruktionsmerkmalen.

Bisher bekannte Konzepte des viskosimetrischen Affinitätssensors basierten auf der aus der Literatur bekannten Erfahrung (vergl. Kulicke, W-M, Polymerlösungen. In: W-M. Kulicke, Herausg., Fließverhalten von Stoffen und Stoffgemischen, Hüthig & Wepf-Verl. Basel, Heidelberg, New York, 52-97, 1986), daß kolloidale Aggregatstrukturen mit reversibler Assoziation der makromolekularen Teilchen schersensitiv sind und die viskosimetrische Erfassung derartiger Strukturen daher mit möglichst geringer Schergeschwindigkeit erfolgen sollte. Daher wurden viskosimetrische Affinitätssensoren so konzipiert und gestaltet, daß im Hohlaserlumen bzw. in der Dialysekammer oszillierende Strömungsbewegungen mit geringer Amplitude und Frequenz realisiert werden können. Unerwartet hat sich gezeigt, daß die durch Affinitätsbindungen strukturierten sensitiven Flüssigkeiten aus Dextran und Concanavalin A bei hohen Schergeschwindigkeiten ($5 \text{ bis } 1000 \text{ s}^{-1}$) empfindlicher und reproduzierbarer mit Viskositätsänderungen auf Änderungen der Analytkonzentration reagieren als bei niedrigen Schergeschwindigkeiten. Bei niedrigen Schergeschwindigkeiten tritt aufgrund von langsamen Strukturänderungen eine unerwartete Abhängigkeit der Viskosität von der Zeit und der Vorbelastung auf. Die Analyse der rheologischen Besonderheiten der sensitiven Flüssigkeiten ergab, daß erst unter dem Einfluß stärkerer Scherfelder die Viskosität der sensitiven Flüssigkeiten eine reproduzierbare und stark von der Konkurrenz mit freien Liganden abhängige Größe wird. Die Abhängigkeit der scherungsbedingten Strukturen von konkurrierenden freien Liganden ermöglicht die erfindungsgemäße räumliche und/oder zeitliche Trennung von Dialyse und Viskositätsmessung, die mit der Anwendung hoher Schergeschwindigkeiten verbunden ist. Die notwendige Diffusion des Analyten in die sensitive Flüssigkeit kann vor der Viskositätsmessung in der ruhenden unbelasteten Flüssigkeit oder bei geringer Schergeschwindigkeit in einem anderen Teil des Flüssigkeitsleiters erfolgen, da bei hohen Schergeschwindigkeiten für die Überführung der sensitiven Flüssigkeit in den Meßraum und die Messung der Viskosität nur eine kurze Zeit benötigt wird.

In dem erfindungsgemäßen viskosimetrischen Affinitätssensor sind die Dimension und die Steuerung der Druckquellen sowie die Dimension der Dialysekammer und gegebenenfalls der zusätzlich vorhandenen Meßkammer so ausgelegt, daß bei der Viskositätsmessung weit höhere Schergeschwindigkeiten als in der Dialysekammer während der Diffusion des Analyten erreicht werden.

Der Sensor kann bei der erfindungsgemäßen zeitlicher oder räumlicher Trennung von Dialyse und Viskositätsmessung ohne die räumliche Eingrenzung beweglicher Menisken im Flüssigkeitsleiter dauerhaft funktionieren. Dadurch, daß hohe Schergeschwindigkeiten zulässig sind, wird die Konstruktion eines austauschfähigen und implantierbaren Sensorteils, dessen Oberfläche als Dialysemembran ausgebildet ist, erleichtert. Die Dialysekammer kann, getrennt von den Pumpen und übrigen Teilen des Flüssigkeitsleiters, in einen nadelförmigen Körper integriert werden, der leicht in eine deformierbare gequollene Matrix einzuführen ist. Durch die Kombination der o.g. Merkmale ist es möglich,

den mit der Flüssigphase der Matrix wechselwirkenden Sensorbestandteil auswechselbar durch flexible Schlauchverbindungen oder flexible Systeme der Kraftübertragung mit den Druckquellen zu verbinden.

In einer Variante des erfindungsgemäß aufgebauten Sensors kann nach Einstellung des Diffusionsgleichgewichtes in der Dialysekammer die den Analyten enthaltende sensitive Flüssigkeit gänzlich oder teilweise durch die Meßkammer gesaugt werden, wobei dessen Strömungswiderstand so gewählt wird, daß die Viskositätsmessung überwiegend durch diesen Vorgang bestimmt wird. Erfolgt die Viskositätsmessung in einer Meßkammer mit vergleichsweise kleinem Volumen, können Dialyse und Viskositätsmessung zeitgleich ablaufen.

Da der Zeitbedarf für die Viskositätsmessung bei hoher Schergeschwindigkeit gering ist, entsteht auch bei zeitlicher Aufeinanderfolge von Dialyse und Viskositätsmessung nur eine unwesentliche Verzögerung zwischen den Austauschvorgängen an der Dialysekammer und der Signalbildung.

Die Erfindung ermöglicht verschiedene vorteilhafte technische Lösungen. Zum Beispiel kann die sensitive Flüssigkeit über Dialysekammer und Viskositätsmeßkammer aus einem Vorratsraum in einen Aufnahmebehälter gepumpt werden, wobei die Einstellung des Gleichgewichts oder Fließgleichgewichts der Analytkonzentration zwischen der Matrix und der sensitiven Flüssigkeit in der Dialysekammer vor deren Eintritt in den Viskositätsmeßraum durch Wahl einer geeigneten Flußrate gewährleistet wird. Der Einfluß des Analyten auf den Fließwiderstand kann am Stromverbrauch der Pumpe, mit Hilfe eines Drucksensors oder an der Bewegung eines Meniskus gemessen werden. Es sind oszillierende und stationäre Flüsse für die Viskositätsmessung nutzbar.

Um einen Wert zu erhalten, der durch den Strömungswiderstand der Flüssigkeitsleiter außerhalb der Dialyse- und Meßkammer wenig beeinflusst ist, kann die kohäsive Verbindung zwischen den sensitiven Teilen und der übrigen im Flüssigkeitsleiter befindlichen sensitiven Flüssigkeit durch eine geeignete Einrichtung getrennt werden, z. B. durch Einleiten eines Gases, Gasgemisches oder eines mit wäßrigen Lösungen nicht mischbaren flüssigen Transportmediums mit geringer Viskosität. Der Meßvorgang kann hierfür in zwei Schritten erfolgen:

1. Äquilibrieren der sensitiven Flüssigkeit in der Dialysekammer mit der zu untersuchenden Matrix,
2. Einleiten des Transportmediums in den Flüssigkeitsleiter nahe der Dialysekammer, wobei die äquilibrierte sensitive Flüssigkeit mit hoher Schubspannung aus der Dialysekammer durch die Meßkammer bewegt wird. Beim zweiten Schritt ist die Messung der analytabhängigen Viskosität möglich.

Die Dialysekammer kann so gestaltet werden, daß sie aus dem Raum zwischen einer Festkörperoberfläche und der Dialysemembran besteht. Für die Herstellung der Dialysekammer können, wie in der Mikrodialyse üblich, Abschnitte einer kommerziell verfügbaren Hohlfaser über eine Kanüle gezogen werden, so daß zwischen der inneren Oberfläche der Hohlfasermembran und der äußeren Oberfläche der Kanüle eine Dialysekammer entsteht. Das Lumen der Kanüle kann als Meßkammer genutzt werden.

Die Viskosität in der Meßkammer kann durch Strömungsmessung bei definiertem Druck oder durch Druck- bzw. Leistungsmessung bei definiertem Volumenfluß erfaßt werden. Im letzten Fall ist es sinnvoll, eine Druckquelle einzusetzen, die aufgrund ihres Baues einen vom Strömungswiderstand unabhängigen Volumenfluß erzeugt, z. B. eine Kolben-

pumpe, die durch einen Elektromotor mit starker Untersetzung betrieben wird. Es sind Varianten des Sensors möglich, bei denen die Pumpe auf einer Seite des Flüssigkeitsleiters mit konstanter Druckdifferenz saugt und auf der anderen mit der gleichen Druckdifferenz drückt. Dies ist beispielsweise durch eine Pumpe mit zwei Kammern erreichbar, wenn die für die Untersetzung der Motordrehzahl eingesetzte Gewindestange zwei gleich starke Kolben bewegt. Neben den genannten Pumpentypen kommen auch dielektrische oder magnetische Pumpen oder durch eine Feder angetriebene Pumpen in Frage.

Die Viskosität in der Meßkammer kann bei definierten Druckdifferenzen durch Erfassung der für die Bewegung eines bestimmten Volumens benötigten Zeit bestimmt werden. Das letztgenannte Meßprinzip läßt sich durch die Messung der Zeit, die für die Bewegung eines Gas-Flüssig-Meniskus zwischen zwei elektrischen oder optischen Marken benötigt wird, realisieren. Wenn die Richtung der Druckdifferenz bei Erreichen einer Marke durch eine geeignete elektronische Steuerung der Druckquelle mit Hilfe von Ventilen geändert wird, bleibt die Bewegung des Meniskus auf den Raum zwischen den beiden Marken beschränkt. Wird auf diese Weise eine oszillierende Bewegung eines Teils des Dialysekammervolumens durch die Meßkammer bewirkt, ist die Periodenlänge der Viskosität proportional und die durch den Wasseraustausch mit der Matrix verursachten Volumenänderungen der sensitiven Flüssigkeit bleiben minimal.

Da die Meßkammer aufgrund der Anwendbarkeit hoher Schergeschwindigkeiten sehr eng und kurz gestaltet werden kann, ist es möglich, die für die Messung benötigten Volumenverschiebungen in der Meßkammer sehr gering zu halten und einen Strömungswiderstand der Meßkammer zu wählen, der deutlich über dem Widerstand für das Nachströmen der sensitiven Flüssigkeit aus der Dialysekammer, der durch die Elastizität der Dialysekammer und die Wasserpermeabilität der Dialysemembran bestimmt wird, liegt. Hierdurch wird eine Viskositätsmessung in der Meßkammer auch dann möglich, wenn die Dialysekammer blind endet und nur einseitig mit dem übrigen Teil des Flüssigkeitsleiters verbunden ist. In diesem Fall resultiert das durch die Meßkammer strömende Volumen aus der Deformierbarkeit der Dialysekammer und die Permeabilität der Dialysemembran für Wasser. Ist der Widerstand für den Wassertransport durch die Dialysemembran störend, ist auf einen geringen Volumenelastizitätsmodul der Dialysekammer (Verhältnis der Druckänderung zur Volumenänderung) zu achten.

Ausführungsbeispiele

A. Der Sensor enthält folgende Teile: einen Elektromotor mit Gewindestange und Bowdenzug, eine Pumpe mit Vorrat an sensitiver Flüssigkeit und Drucksensor (Abb. 1, oben), eine Dialysenadel (Abb. 1, Mitte) und ein Probensammelgefäß.

Der Elektromotor bewegt mit starker Untersetzung eine Gewindestange, mit deren Hilfe ein dünner Metalldraht durch einen Bowdenzug verschoben werden kann. Eine Pumpenkammer ist hinsichtlich ihres Volumenelastizitätsmoduls so auf die Größe der Dialysekammer und die Empfindlichkeit des Drucksensors abgestimmt, daß eine Volumenänderung, die kleiner als das Volumen der Dialysekammer ist, eine gut meßbare Druckänderung bedingt. Der Innenraum der Pumpenkammer ist durch eine flexible Membran zweigeteilt. Ein Raum enthält einen Drucksensor (1) und ist mit gasfreiem Silikonöl gefüllt. Dieser Raum enthält das freie Ende des Bowdenzuges, der durch eine gepreßte Silikongummi-Dichtung hinein- oder herausbewegt werden

kann. Der andere Raum enthält ausschließlich die sensitive Flüssigkeit und ist über eine kurze Polypropylenschlauchverbindung (ca. 10 mm) mit der Dialylenadel verbunden. Die sensitive Flüssigkeit enthält den Analyten, z. B. Glucose in einer Konzentration, die dem Erwartungswert entspricht. Die Dialylenadel (Abb. 1, Mitte) enthält, wie für die Mikrodialyse üblich, eine Kapillare, welche von Dialysekammern umgeben ist, die nach außen durch die Wand einer Dialysehohlfaser abgeschlossen werden. Die Dialysekammern sind weiter als die Kapillare. Sie sind an der Basis der Dialylenadel durch eine kurze Schlauchleitung mit dem Probensammelbehälter verbunden. Die Dialylenadel und die Polypropylenschläuche sind mit sensibler Flüssigkeit gefüllt. Die Dialylenadel besitzt einen höheren Strömungswiderstand als die Schlauchleitungen. Der kleinumige Probensammelbehälter ist ein kurzes, zur Atmosphäre offenes Polypropylenrohr, dessen Wand mit saugfähigem Material ausgekleidet ist.

Diese Variante des Sensors ermöglicht folgende Gestaltung des Meßvorgangs:

Der Metalldraht des Bowdenzuges wird in das Silikonöl so weit hineingeschoben, daß die Volumenänderung zum vollständigen Ersatz der sensitiven Flüssigkeit in der Dialysekammer ausreicht. Die Geschwindigkeit dieses Verdrängungsvorganges ist so bemessen, daß hierbei eine gut meßbare Druckerhöhung am Sensor (ca. 0,5 bar) registriert wird. Das Druckzeitverhalten während des Vortriebes oder die Druckrelaxation nach Beendigung des Vortriebes des Metalldrahtes werden elektronisch ausgewertet. Nach einer Dialysezeit von ca. 2 oder 3 min wird der Metalldraht in entgegengesetzter Richtung um ein geringeres Maß als beim Vortrieb, z. B. die Hälfte des Vortriebes, verschoben. Die hierbei oder anschließend auftretende Druckänderung wird ebenfalls elektronisch ausgewertet. Aus Differenzen oder Quotienten der bei der Vorwärts- und Rückwärtsbewegung gemessenen Parameter, z. B. der Geschwindigkeitskonstanten der beiden Druckrelaxationsprozesse, wird die Abweichung der Analytkonzentration vom Sollwert mit Hilfe einer Eichkurve bestimmt. Die Bezugnahme auf den Sollwert der Analytkonzentration hat den Vorteil, daß hierdurch die Notwendigkeit einer Temperaturkompensation entfällt. Dadurch, daß ein größeres Volumen in Richtung Sammelbehälter verschoben wird als in entgegengesetzter Richtung, wird gewährleistet, daß sich die Dialysekammer vor jeder Messung mit sensibler Flüssigkeit definierter Zusammensetzung füllt, die nicht signifikant durch die osmotischen Prozesse an der Hohlfasermembran verändert wird.

B. Der Flüssigkeitsleiter des Sensors besteht aus einer Pumpe mit Vorratsraum für die sensitive Flüssigkeit, einer Dialylenadel, einem Elektrodenraum (Abb. 1, unten) und einem Probensammelbehälter, der an einen Unterdruckbehälter und eine Vakuumpumpe angeschlossen ist.

Eine Dialylenadel wird an dünne Polypropylenschläuche angeschlossen. Einer der Schläuche verbindet die Dialysekammern mit dem Vorratsgefäß für die sensitive Flüssigkeit, der andere die Kapillare mit dem Sammelbehälter für verbrauchte sensitive Flüssigkeit. Der Probensammelbehälter und die Pumpe für die sensitive Flüssigkeit sind wie in Beispiel A ausgeführt, jedoch ist ein Drucksensor nicht erforderlich. Der Probensammelbehälter kann wahlweise über Ventile mit einem Unterdruckbehälter oder der Atmosphäre verbunden werden. Im Unterdruckbehälter wird ein definierter Unterdruck mit Hilfe einer Vakuumpumpe aufrechterhalten. Nahe der Dialylenadel ist das Lumen der Polypropylenleitung zwischen den Dialysekammern und der Pumpe für die sensitive Flüssigkeit verengt (Innendurchmesser ca. 200 µm) und ihre Wandung wird durch mit Wasser nicht benetzbare feine hydrophobe Poren durchbrochen. Die Meß-

kapillare ist in Flußrichtung der Dialysehohlfaser nachgeschaltet. An die Meßkapillare schließt sich abflußseitig ein zylindrischer Elektrodenraum (Abb. 1, unten) mit einem Durchmesser von ca. 200 µm an. In seiner Innenwand befinden sich in einem bestimmten Abstand 2 Paare elektrisch isolierter Elektroden. An Hand der Kapazität der Elektroden in einem Wechselstromkreis ist feststellbar, ob sich zwischen ihnen sensitive Flüssigkeit oder Luft befindet. Der Elektrodenraum ist über Polypropylenschläuche mit dem Probensammelbehälter für die verbrauchte sensitive Flüssigkeit verbunden.

Diese Variante des Sensors ermöglicht folgende Gestaltung des Meßvorgangs:

Der Probensammelbehälter wird auf Atmosphärendruck gebracht. Danach wird mit Hilfe der Pumpe eine kleine Menge der sensitiven Flüssigkeit durch die Dialylenadel und den Elektrodenraum in den Vorratsbehälter gedrückt. Anschließend wird die Flüssigkeitssäule zurückbewegt, bis sich der Meniskus im Elektrodenraum am ersten Elektrodenpaar (2) befindet. Nach einer Dialysezeit von 3 min wird das Ventil zur Atmosphäre geschlossen und das Ventil zum Unterdruckbehälter geöffnet. Hierdurch wird die Flüssigkeitssäule unter Spannung gesetzt, und es dringt an der porösen Stelle Luft in die Polypropylenleitung ein. Dabei bewegt sich eine kleine, vom Vorrat abgetrennte Menge der sensitiven Flüssigkeit durch die Dialylenadel in Richtung Sammelbehälter. Die Zeit, die von der Öffnung des Vakuumventils bis zur Verdrängung der Luft am zweiten Elektrodenpaar (3) verstreicht, wird mit Hilfe eines elektronischen Zählers gemessen. Sie ist ein Maß für die durch den Analyten beeinflusste Viskosität der sensitiven Flüssigkeit nach Dialyse. Nach Durchtritt durch die Dialylenadel bewegt sich die zur Messung verwendete Menge der sensitiven Flüssigkeit in den Sammelbehälter. Nach der hierfür erforderlichen Zeit wird der Sammelbehälter wieder auf Atmosphärendruck gebracht. Anschließend wird das Hohlleitersystem wieder vollständig mit sensibler Flüssigkeit gefüllt, um die nächste Messung vorzubereiten.

C. Der Sensor enthält in Reihe geschaltet folgende Teile des Flüssigkeitsleiters: eine Pumpe für die sensitive Flüssigkeit, einen Elektrodenraum, eine Dialylenadel und einen Sammelbehälter, der über Ventile mit der Atmosphäre oder einem Druckbehälter verbunden ist.

Die Pumpe für die sensitive Flüssigkeit, der Elektrodenraum, die Dialylenadel und der Sammelbehälter sind gestaltet, wie in Beispiel A und B beschrieben. Die Dialylenadel wird so an Polypropylenschlauchleitungen angeschlossen, daß der Dialyseraum abflußseitig an den Probensammelbehälter für verbrauchte sensitive Flüssigkeit angeschlossen ist. In kurzer Entfernung vom Elektrodenraum befindet sich an der Polypropylenleitung eine kurze, englumige Abzweigung, die über ein Gaseintrittsventil mit der Atmosphäre verbunden ist. Der Elektrodenraum befindet sich zwischen dieser Lufteintrittsmöglichkeit und der Meßkapillare. Das Volumen zwischen den beiden Elektroden entspricht annähernd dem Volumen der Dialysekammer. An die Dialysekammer schließt sich in kurzer Entfernung der Probensammelbehälter an, der über einen Polypropylenschlauch mit einem Gasdruckbehälter gekoppelt ist. In der Polypropylenleitung zwischen dem Gasdruckbehälter und dem Sammelgefäß befinden sich Ventile, mit deren Hilfe der Sammelbehälter entweder mit dem Druckbehälter oder mit der Atmosphäre in Verbindung gebracht werden kann.

Diese Variante des Sensors ermöglicht folgende Gestaltung des Meßvorgangs:

Mit Hilfe der Pumpe für die sensitive Flüssigkeit wird eine kleine Menge der sensitiven Flüssigkeit, die etwa dem Zweifachen des Volumens der Dialysekammer entspricht,

mit geringer Geschwindigkeit in den Sammelbehälter gedrückt. Dabei ist das Gaseintrittsventil in der Abzweigung geschlossen. Durch eine Kolbenpumpe wurde inzwischen der Gasdruckbehälter auf einen definierten Unterdruck gebracht. Das Gaseintrittsventil an der Abzweigung und das Unterdruckventil zum Sammelbehälter werden geöffnet. Es dringt an der Abzweigung Luft in die Schlauchleitung und beim Strömen der Flüssigkeit durch die Dialysezadel bewegt sich der Meniskus durch den Elektrodenraum. Die Zeit, die zur Bewegung des Meniskus zwischen den beiden Elektrodenpaaren benötigt wird, ist der Viskosität der sensitiven Flüssigkeit vor Gleichgewichtseinstellung mit der Meßlösung proportional. Nachdem der Meniskus das der Meßkapillare nächstliegende Elektrodenpaar erreicht hat, wird das Ventil zum Druckbehälter geschlossen und der Sammelbehälter durch Öffnen eines Ventils zur Atmosphäre auf Atmosphärendruck gebracht, wodurch die Flüssigkeitssäule zum Stehen kommt. Während der Dialysezeit von 2 bis 3 Minuten wird bei geschlossenem Ventil ein definierter Überdruck im Gasdruckbehälter erzeugt. Nach der Dialysezeit wird der Gasdruckbehälter wieder mit dem Probensammelgefäß verbunden, wodurch der Meniskus zurückbewegt wird. Hierbei fließt die durch den Analyten veränderte sensitive Flüssigkeit durch die Meßkapillare zurück, so daß eine durch den Analyten veränderte Viskosität durch die Verschiebungszeit des Meniskus zwischen den beiden Elektrodenpaaren bestimmt wird. Auch bei dieser Anordnung kann die sensitive Flüssigkeit in der Pumpe den Analyten in einer definierten Sollwert-Konzentration enthalten. Die Abweichung von dieser Konzentration kann aus dem Verhältnis der Verschiebungszeiten für die beiden Bewegungsrichtungen erfaßt werden. Da das Verhältnis der Affinitätsvermittelten Viskositäten bei unterschiedlichen Analytkonzentrationen wenig von der Temperatur abhängt liefert diese Variante des Affinitätsensors auch ohne Thermostaten genaue Werte.

D. Der Sensor enthält eine blind endende Hohlfaser, die an einer nadelförmigen, auf Siliziumbasis hergestellten Kapillare mit Kapazitätsmeßkammer (Abb. 2) befestigt ist.

Ein n-leitendes, ca. 200 µm starkes, 0,5 mm breites und 20 mm langes Halbleitersubstrat (1), welches mittels bekannter Verfahren gas- und wasserdicht mit einer ähnlich gestalteten Deckplatte aus Borsilikatglas verbunden ist, enthält einen tiefen dreieckigen Einschnitt (4) und einen angrenzenden flacheren Binschnitt (3), wodurch eine nach oben durch die Glasplatte (2) begrenzte durchgehende Kapillare entsteht. Die Innenwand der Kapillare ist durch thermische Oxidation des Siliziumsubstrates nach der V-Grabenätzung vollständig mit SiO₂ ausgekleidet. Der durch den tieferen Einschnitt (4) gebildete Kapillarteil besitzt einen im Vergleich zum Einschnitt (3) etwa 5fachen Querschnitt und wird seitlich durch zwei p-leitende Halbleiterzonen (5) und (6) begrenzt. Letztere sind durch den Einschnitt selbst und das n-leitende Siliziumsubstrat voneinander getrennt. Die p-leitenden Halbleiterzonen (5) und (6) sind mit Kontakten (5a) und (6a) versehen, welche mittels dünner Anschlußdrähte mit dem Eingang einer miniaturisierten, an dem Kapillarkörper befestigten Kapazitätsmeßvorrichtung (7) verbunden werden. Der so aufgebaute nadelförmige Sensorkörper wird auf der Seite der engeren Kapillare im Gebiet (10a) wasserdicht mit der einseitig verschlossenen Hohlfaser verbunden. Die so gebildete Dialysekammer ist mit der sensitiven Flüssigkeit (11) gefüllt, welche über die Meßkapillare (3) und die als Elektrodenraum ausgebildete weitere Kapillare (4) mit einem Gasraum (9) in Verbindung steht. Dieser Gasraum besteht aus einem dünnen Gasschlauch (8) mit einem Durchmesser < 2 mm, welcher mit dem nadelförmigen Sensorkörper gasdicht verbunden ist. Der Schlauch führt

zu einer Über- und Unterdruck erzeugenden Gaspumpe (-0,1 bis +0,3 MPa). Die vorstehend beschriebene nadelförmige Sensoranordnung kann in eine Kanüle eingepaßt und mit ihrer Hilfe in die zu untersuchende Matrix bzw. ein Gewebe eingestochen werden.

Diese Variante des Sensors ermöglicht folgende Gestaltung des Meßvorgangs:

Durch Anwendung eines Gasvordruckes von ca. 3 bar wird die Flüssigkeit bis zur Verjüngungsstelle der Kapillare innerhalb einer Zeit $t < 10$ s herausgedrückt. Dabei entweicht Wasser durch die Hohlfasermembran in die Matrix und der Dialyseraum wird leicht gedehnt. Bei Unterschreitung einer Grenzkapazität zwischen den Kontakten (5a) und (6a), welche der Entleerung des Elektrodenraumes (4) entspricht, wird der Gasraum evakuiert, wodurch sich die Meßkapillare wieder füllt. Der Füllvorgang wird nach Überschreiten einer Maximalkapazität abgebrochen. Anschließend kann der Zyklus von neuem gestartet werden. Beim Füllvorgang wird mittels der Kapazitätsänderung die Geschwindigkeit, mit welcher sich der Vorraum (4) füllt, gemessen. Diese Geschwindigkeit hängt von der Viskosität und damit von der Glucosekonzentration in der Meßkammer ab. Zur Verhinderung von Differenzen zwischen den Glucosekonzentrationen in der Meßkammer und der Dialysekammer ist eine wiederholte Füllung und Entleerung der Meßkammer zweckmäßig.

Patentansprüche

1. Viskosimetrischer Affinitätsensor auf der Grundlage eines für die sensitive Flüssigkeit durchströmbar-Flüssigkeitsleiters mit Dialysekammer und angeschlossener Pumpe, gekennzeichnet durch folgende Merkmale:

- die Steuerung des Druckes und die Geometrie des Flüssigkeitsleiters ermöglichen eine zeitliche und/oder räumliche Trennung der Diffusion des Analyten in die sensitive Flüssigkeit von der Viskositätsmessung,
- Pumpleistung und Flüssigkeitsleiter sind so ausgelegt, daß die maximale Schergeschwindigkeit, die während des Meßvorganges in der sensitiven Flüssigkeit auftritt, die maximale Schergeschwindigkeit, die während des Dialysevorganges in der sensitiven Flüssigkeit in der Dialysekammer auftritt, um mehr als das Zweifache übersteigt und mindestens 5 s^{-1} beträgt.

2. Viskosimetrischer Affinitätsensor nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch folgendes Merkmal:

die Dialysekammer ist Teil eines Körpers, der sich nach Art einer Nadel ohne starke Volumenverdrängung und Strukturzerstörung in eine viskoelastische flüssigkeitshaltige Matrix, z. B. das Unterhautgewebe, eindrücken läßt.

3. Viskosimetrischer Affinitätsensor nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch folgende Merkmale:

- die Dialysekammer ist hydraulisch mit einer gesonderten Meßkammer verbunden,
- der Sensor enthält eine Vorrichtung für die Messung des Strömungswiderstandes in der Meßkammer.

4. Viskosimetrischer Affinitätsensor nach Anspruch 3, gekennzeichnet durch folgendes Merkmal:

der Fließwiderstand der Meßkammer ist bestimmend für den Fließwiderstand des gesamten mit der sensitiven Flüssigkeit gefüllten Sensorraumes.

5. Viskosimetrischer Affinitätsensor nach Anspruch 3, gekennzeichnet durch folgendes Merkmal:

Dialysekammer und Meßkammer liegen in Reihe in einem gemeinsamen durchströmbareren Flüssigkeitsleiter.

6. Viskosimetrischer Affinitätssensor nach Anspruch 5, gekennzeichnet durch folgendes Merkmal:

der Flüssigkeitsleiter ist hydraulisch oder pneumatisch mit einem Raum verbunden, in dem sich ein Drucksensor befindet.

7. Viskosimetrischer Affinitätssensor nach Anspruch 3, gekennzeichnet durch folgendes Merkmal:

die Meßkammer befindet sich im Inneren, die Dialysekammer an der Oberfläche eines nadelförmigen Körpers.

8. Viskosimetrischer Affinitätssensor nach Anspruch 3, gekennzeichnet durch folgendes Merkmal: die sensitive Flüssigkeit füllt die Dialysekammer und die Meßkammer aus und grenzt in dem Meßraum oder in einem Vorraum, der die Meßkammer mit der Pumpe verbindet, an das oder ein anderes mit Wasser nicht mischbares niederviskoses Medium.

9. Viskosimetrischer Affinitätssensor nach Anspruch 8, gekennzeichnet durch folgendes Merkmal:

der Vorraum enthält eine oder mehrere Elektroden, mit deren Hilfe die Position des Meniskus erfaßt werden kann.

10. Viskosimetrischer Affinitätssensor nach Anspruch 9, gekennzeichnet durch folgendes Merkmal:

mindestens eine der Elektroden ist gegenüber den anderen und gegenüber der Flüssigkeit elektrisch isoliert.

11. Viskosimetrischer Affinitätssensor nach Anspruch 3, gekennzeichnet durch folgendes Merkmal:

der Sensor enthält eine Vorrichtung zur Unterbrechung der kontinuierlichen Flüssigkeitsverbindung zwischen der Dialysekammer und der Meßkammer oder zwischen der Dialysekammer und einer Pumpe.

12. Viskosimetrischer Affinitätssensor nach Anspruch 11, gekennzeichnet durch folgendes Merkmal:

der Flüssigkeitsleiter ist an eine Pumpe zur Förderung eines flüssigen oder gasförmigen Transportmediums für die sensitive Flüssigkeit und an eine oder mehrere Dosiervorrichtungen zur Einführung definierter Volumina der sensitive Flüssigkeit und gegebenenfalls anderer Flüssigkeiten in das Transportmedium angeschlossen.

13. Viskosimetrischer Affinitätssensor nach Ansprüchen 4, 5 und 11, gekennzeichnet durch folgendes Merkmal:

die Vorrichtung zur Unterbrechung der kontinuierlichen Flüssigkeitsverbindung besteht aus feinen, mit Wasser nicht benetzbaren Poren in der Flüssigkeitsleiterwand.

14. Viskosimetrischer Affinitätssensor nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch folgendes Merkmal:

die Dialysekammer besteht aus dem Raum zwischen einer Festkörperoberfläche und der Dialysemembran.

15. Viskosimetrischer Affinitätssensor nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch folgendes Merkmal:

die Pumpe besitzt mindestens 1 Pumpenkammer, in der ein Kolben mit Hilfe eines Elektromotors über eine starke Untersetzung mit weitgehend druckunabhängiger Geschwindigkeit bewegt werden kann.

16. Viskosimetrischer Affinitätssensor nach Anspruch 15, gekennzeichnet durch folgende Merkmale:

– der Kolben ist das Ende eines Metalldrahtes, der nach Art eines Bowdenzuges in einem flexiblen Rohr geführt wird,

– die Pumpenkammer ist gänzlich oder teilweise mit der sensitive Flüssigkeit gefüllt und enthält einen Drucksensor.

17. Viskosimetrischer Affinitätssensor nach Anspruch 16, gekennzeichnet durch folgende Merkmale:

– die Pumpenkammer wird durch eine flexible Membran in zwei Räume geteilt, von denen einer mit der sensitive Flüssigkeit gefüllt und mit der Dialysekammer verbunden ist, während der andere den Kolben enthält und nach außen geschlossen ist,

– die Volumenelastizität der Pumpenkammer ist auf die Größe der Dialysekammer und die Empfindlichkeit des Drucksensors so abgestimmt, daß eine Volumenänderung der Pumpenkammer, die dem Volumen der Dialysekammer gleicht oder kleiner als dieses ist, eine gut meßbare Druckänderung zur Folge hat.

18. Viskosimetrischer Affinitätssensor nach Anspruch 3, gekennzeichnet durch folgendes Merkmal:

die Dialysekammer befindet sich einem Hohlfaserssegment, das an einem Ende verschlossen ist und deren anderes Ende eine Verbindung zur Meßkammer und den übrigen flüssigkeitsleitenden Hohlräumen des Sensors besitzt.

19. Viskosimetrischer Affinitätssensor nach Anspruch 18, gekennzeichnet durch folgendes Merkmal:

die Deformierbarkeit der Dialysekammer ist ausreichend, um eine für die Viskositätsmessung erforderliche Volumenverschiebung bei geringem Druck zu gewährleisten.

20. Viskosimetrischer Affinitätssensor nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch folgendes Merkmal:

der Sensor enthält in einem Vorratsraum eine sensitive Flüssigkeit, die den Analyten in einer dem Erwartungswert näherkommenden Konzentration enthält.

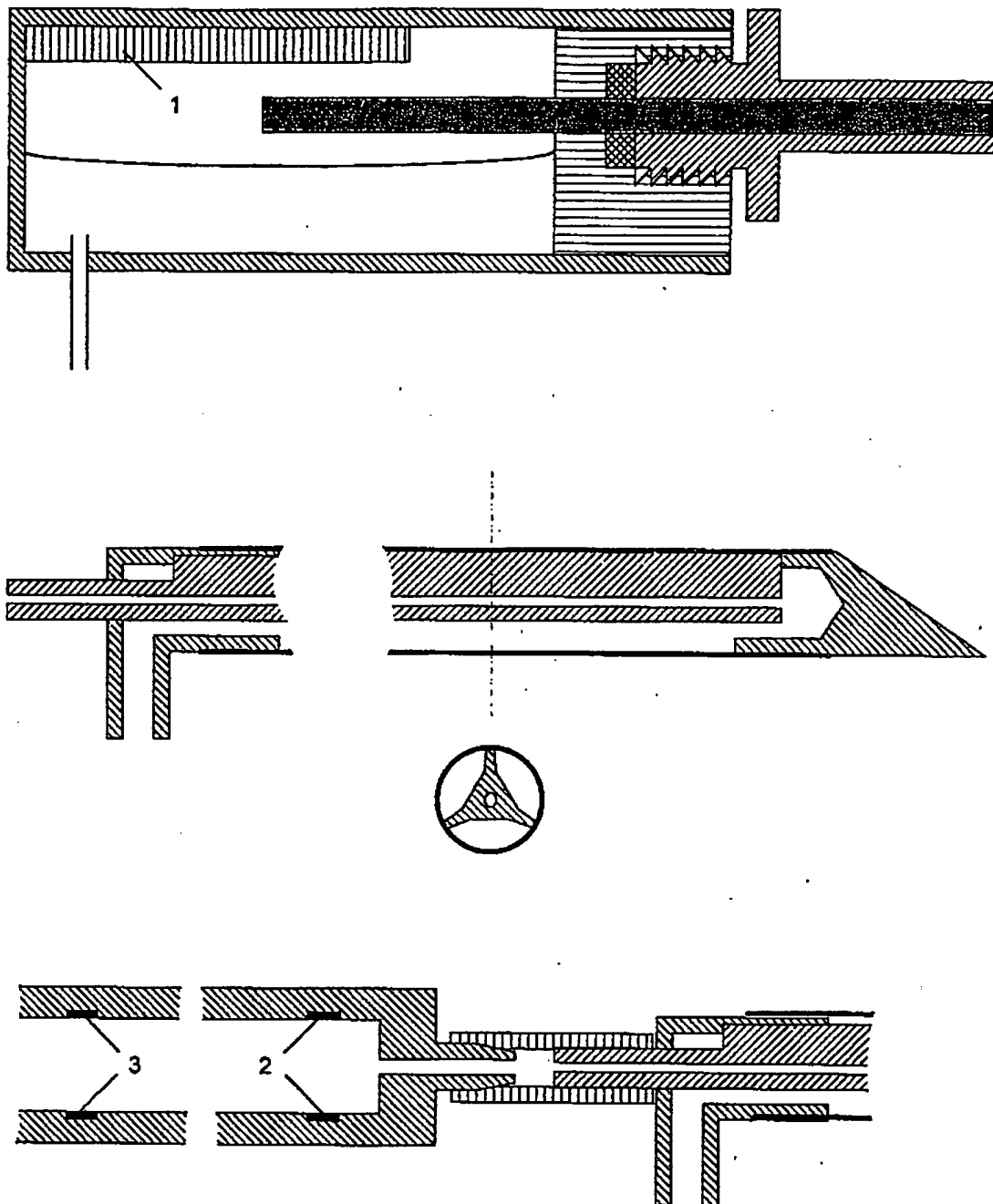
21. Viskosimetrischer Affinitätssensor nach Ansprüchen 8, 9 und 10, gekennzeichnet durch folgendes Merkmal:

Meßraum und Vorraum sind in einen auf der Basis der Siliziumtechnologie hergestellten nadelförmigen Körper integriert.

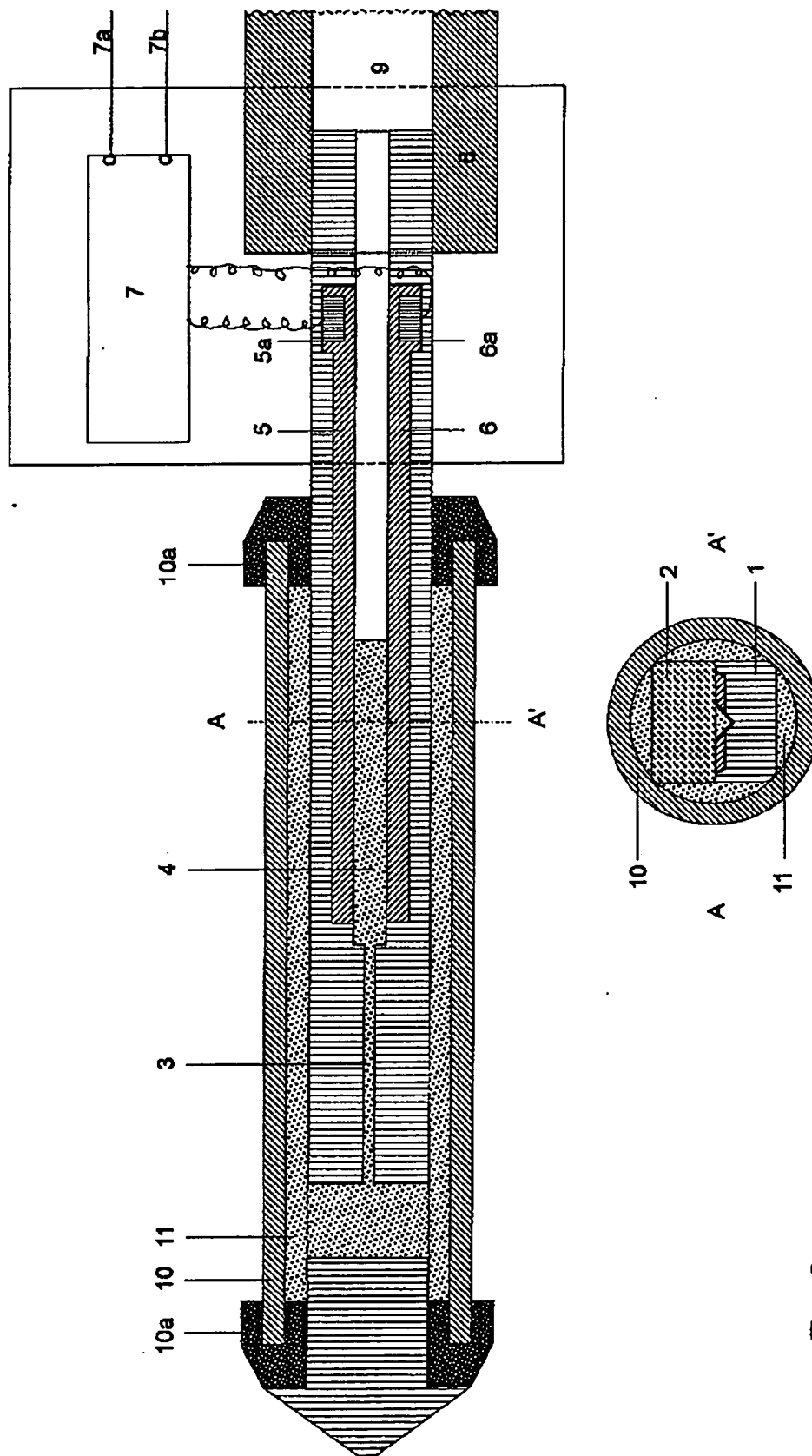
22. Viskosimetrischer Affinitätssensor nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch folgendes Merkmal:

der Sensor enthält einen Behälter für die beim Meßvorgang verbrauchte sensitive Flüssigkeit, in dem sich ein saugfähiges Material für wäßrige Lösungen befindet.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen



Figur 1



Figur 2